动 物 学 研 究 1994，15（增刊）：107—118　　CN 53-1040／Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research

鲂成体组织及胚胎发育过程中同工酶表达的研究*

汪亚平　刘焕章
（中国科学院水生生物研究所　武汉　430072）

摘要　采用淀粉凝胶电泳方法分析鲂成体不同组织(脑、眼、肌、心、肝、肾)和早期发育阶段 9 种同工酶(LDH、MDH、ADH、IDH、GTDH、IDDH、G3PDH、SOD、EST)的分化表达模式。鲂同工酶的表达具有明显的组织特异性。早期发育阶段 LDH、IDH、IDDH、SOD 和 EST 具有不同的发育变化谱式，而 MDH、ADH、GTDH 和 G3PDH 酶谱在整个早期发育阶段均无明显变化。上述结果可以为鲂种群遗传结构分析、种群演化以及鲂类的系统发育问题提供基础资料。

关键词　电泳，同工酶，发育遗传学，鲂

对成体不同组织及胚胎发育过程中同工酶的不同表达进行研究，旨在通过对同工酶时空调控机制的研究，来探讨基因的分化和基因调控机制的演化等问题，为进一步研究生物的遗传、进化问题奠定基础。国外在海水鱼类上作了大量工作，国内的同类研究报道甚少(罗莉中等，1984；王祖熊等，1985；傅予昌等，1988；吴力钊等，1987a、1987b)。因此，对我国淡水鱼类的代表类群进行同工酶的时空调控机制的研究是很有意义的。

鲂(*Megalobrama skolkovii* Dybowsky)是我国东部较广布的种类，是东亚淡水鱼类类群的典型代表之一，也是重要的经济鱼类。有关鲂的生物学和分类问题研究较多，但在同工酶方面的研究仍为空白。本研究以鲂为材料，通过研究早期发育过程中同工酶的变化及成体组织中的特异性表达，探讨鲂个体发生过程中同工酶基因分化表达的一般模式及其与形态分化和器官形成的相关性，为鲂种群遗传结构分析、人工育种、以及系统发育研究提供基础资料。

1　材料与方法

1.1　材料来源及样品制备

从红安县金沙河水库取得 1 冬龄鲂鱼暂养于本所实验鱼池。取脑、眼、肌、心、肝、肾等 6 种组织作同工酶特异性表达的研究。实验鱼 8 尾。

早期发育材料从红安县金沙河水库获得受精卵，置室内解剖盘中孵化，水温 25℃(未受精卵冰冻供分析用)。从未受精卵到卵黄吸收完各分 11 期取样(表 1)。

---

* 中国科学院分类区系特别支持费资助项目

本文 1994 年 8 月 26 日收到，同年 12 月 28 日修回

表1 鲂早期发育时序及主要形态特征(水温25℃)

Tab. 1 Time schedule and major morphological features of samples taken from the early developing *Megalobrama skolkovii* (water temperature 25℃)

样品编号	发育时期	受精后时间(h)	主要形态特征	样品编号	发育时期	受精后时间(h)	主要形态特征
1	未受精卵	0：00		2	原肠中期	6：16	胚盘下包一半
3	眼囊期	12：00	7—8对肌节	4	晶体形成、肌动	17：00	晶体出现
5	心跳期	23：40	心脏跳动	6	出膜后	47：55	大部分出膜
7	眼黄色素期	61：00	眼睛一半黄色	8	眼黑色素期	72：12	眼睛沉积黑色素多
9	体色素形成期	95：50	体表色素细胞沉积	10	鳔一室期	126：35	鳔一室，充气
11	卵黄吸尽期	192：00	卵黄吸收完毕				

样品制备中采用0.1 mol／L磷酸缓冲液(pH7.0) (Waples，1987)，其它均按吴力钊等(1987a，1987b)报道的方法制备。

1.2 电泳及组织化学染色

取国产马铃薯淀粉(上海)，按改良的Smith(1955)方法水解1 h。在4℃的条件下，分别采用改良的垂直板和水平板淀粉凝胶电泳(胶浓度12.5%)(Hunter等，1957；Murphy等，1990)。每个样品槽点样20—25 μl，电压梯度3.5—8.0 V／cm，电泳时间12—20 h。电泳分析每种同工酶系统采用下列3种缓冲系统之一。

Tris-柠檬酸缓冲系统(TCⅠ)，pH7.0(Shaw等，1970)。用来分析MDH、IDH、LDH、IDDH。

Tris-柠檬酸缓冲系统(TCⅡ)，pH8.0(Murphy等，1990)。用来分析LDH、ADH、GTDH、G3PDH。

Tris-硼酸-EDTA缓冲系统(EBT)，pH7.0(Wilson等，1973)。用来分析EST和SOD。

电泳结束后按改良的Shaw和Prasad (1970)及Murphy等(1990)的方法染色。

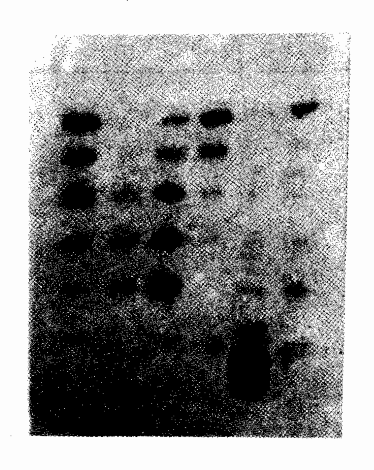
2 结果

2.1 不同组织中同工酶基因的分化表达模式

2.1.1 乳酸脱氢酶(LDH)(EC1.1.1.27) 鲂的LDH同工酶为四聚体，明显有3个基因座位(Ldh-A，-B，-C)编码。鲂的Ldh-C基因仅在肝脏中表达，而Ldh-A和-B基因在脑、眼、肌、心、肝、肾等6种组织中均表达(图1)。其中，Ldh-A基因在主行厌氧代谢的肌肉组织中优势表达，而Ldh-B基因则在供氧充足的心肌中优势表达(Markert等，1983)。另外，在肝组织有一靠近起点的阳极带，与李思发等(1990)在鲢、鳙鱼肝组织中观察到的情况相似，认为此阳极带为-C基因的等位基因-C_2基因，在所检测样品的肝组织均能观察到。在肝和肾组织中，A_2B_2与AB_3之间、B_4与A_3B之间可以看到副带，其它研究中也曾观察到类似的情形(吴力钊等，1987a；Markert等，1983；Shaklee等，1973)。

2.1.2 苹果酸脱氢酶(MDH)(EC 1.1.1.37) 鲂的MDH同工酶为二聚体，分上清液型(s-MDH)和线粒体型(m-MDH)。二者均由两个基因座位(s-MDH-A、-B和m-MDH-C、-D)编码。4个MDH基因座位在所有分析的6种组织中均有表达。肝及

脑中−A_2染色活性明显增大(图 2)。



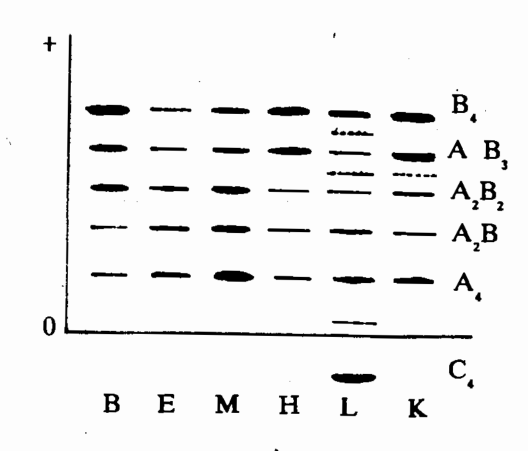
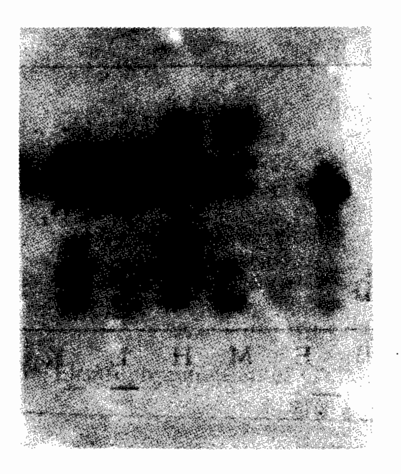


图 1　鲂不同组织中的 LDH 电泳图谱

Fig. 1　Electrophoretogram of LDH isozymes expressed in various tissues of *Megalobrama skolkovii*

B：脑(Brain)；E：眼(Eye)；M：肌(Muscle)；H：心(Heart)；L：肝(liver)；
K：肾(Kidney)；O：原点(Origin)。(下同)



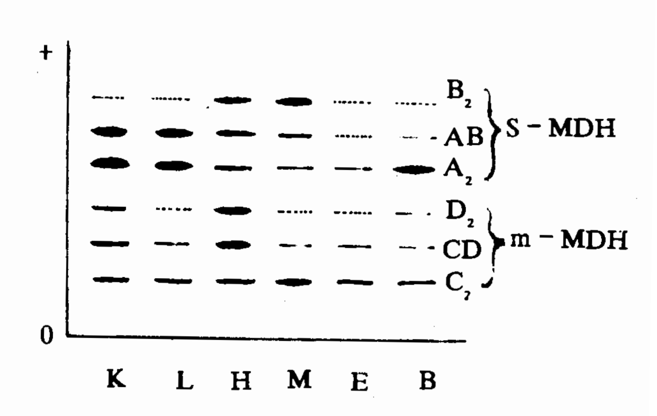


图 2　鲂不同组织中的 MDH 电泳图谱

Fig. 2　Electrophoretogram of MDH isozymes expressed in various tissues of *Megalobrama skolkovii*

2.1.3　异檬酸脱氢酶(IDH)(EC1.1.1.42)和乙醇脱氢酶(ADH)(EC1.1.1.1)　鱼类的 IDH 同工酶可分为 NAD 型(NAD 作为辅酶)和 NADP 型(NADP 作为辅酶)。这两类 IDH 同工酶有不同的代谢功能。鲂的 NADP 型 IDH 只在肝中观察染色很浅的酶带，其它组织未见表达(图 3a)。鲂的 ADH 也只在肝中见 1 条带(图 3b)。

① 伊地醇脱氢酶，原名山梨醇脱氢酶，缩写为 SDH 或 SORD。

2.1.4 伊地醇脱氢酶(IDDH)(EC1.1.1.14)① 鲂的 IDDH 由两个基因编码，在肝脏中有 1 条高染色活性的阴极带和 1 弱染色活性的阳极带，在心、肾中也可看到 1 条弱染的阴极带，但未能看到阳极带(图 4)。

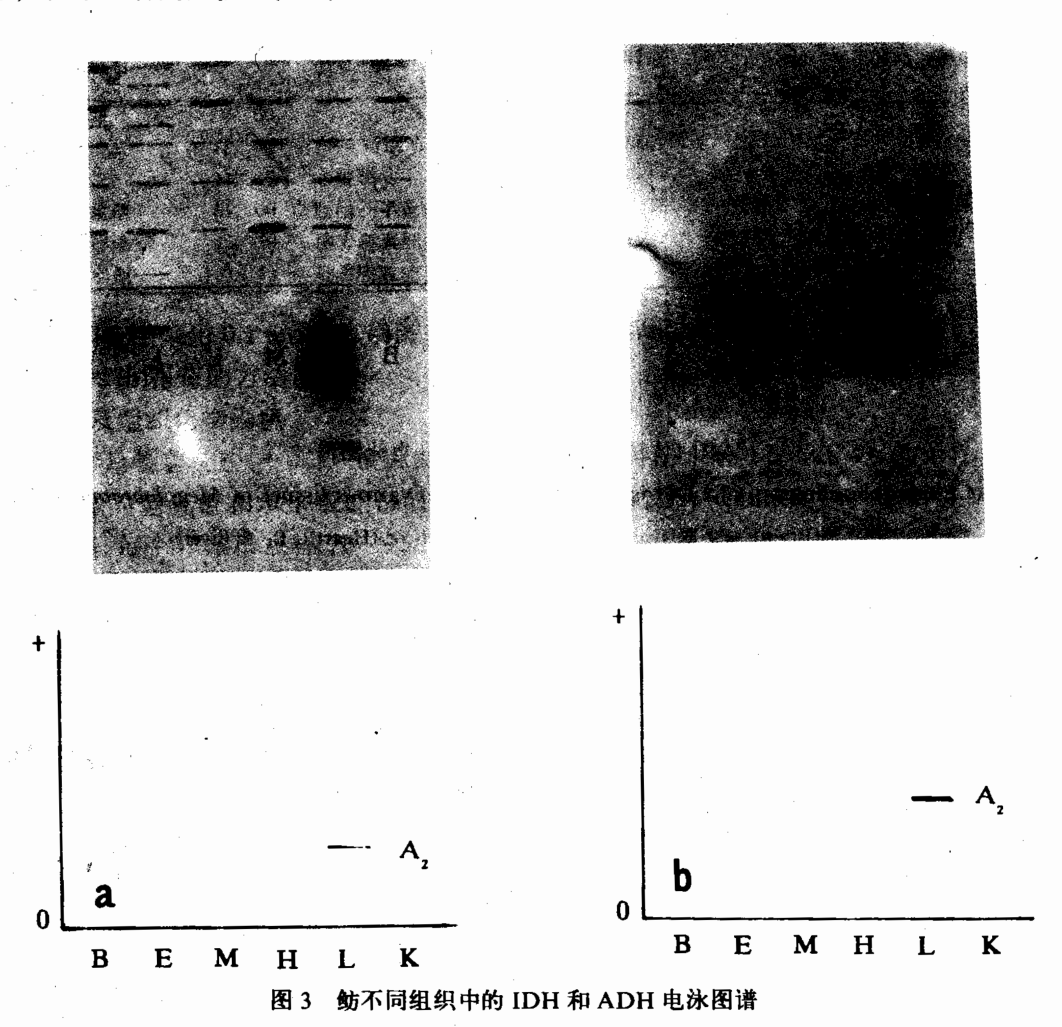


图 3 鲂不同组织中的 IDH 和 ADH 电泳图谱

Fig. 3 Elcectrophoretogram of IDH and ADH isozymes expressed in various tissues of *Megalobrama skolkovii*

2.1.5 谷氨酸脱氢酶(GTDH)(EC1.4.1.2)② 鲂的 GTDH 只在肝脏中有 1 条酶带，其余组织中未观察到酶带。它是由 1 个 Gdh-1 基因编码的单体酶或单一亚基的多聚体酶(图 5)。

2.1.6 甘油-3-磷酸脱氢酶(G3PDH)(EC1.1.1.8)③ 鲂的 G3PDH 为二聚体酶，由两个座位(-A、-B)编码。在所分析的 6 种组织中均有 3 条酶带，其中肝中酶活性显然增高，在脑中只有微弱的染色活性(图 6)。

② 谷氨酶脱氢酶原缩写为 GDH。

③ 甘油-3-磷酸脱氢酶原名为 α-甘油磷酸脱氢酶，缩写为 α-GPDH。

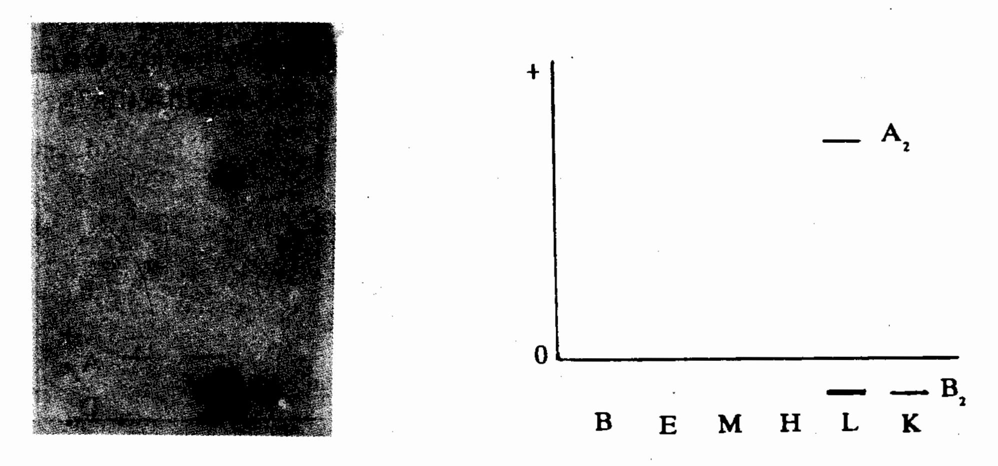


图 4　鲂不同组织中的 IDDH 电泳图谱

Fig. 4 Electrophoretogram of IDDH isozymes expressed in various tissues of *Megalobrama skolkovii*

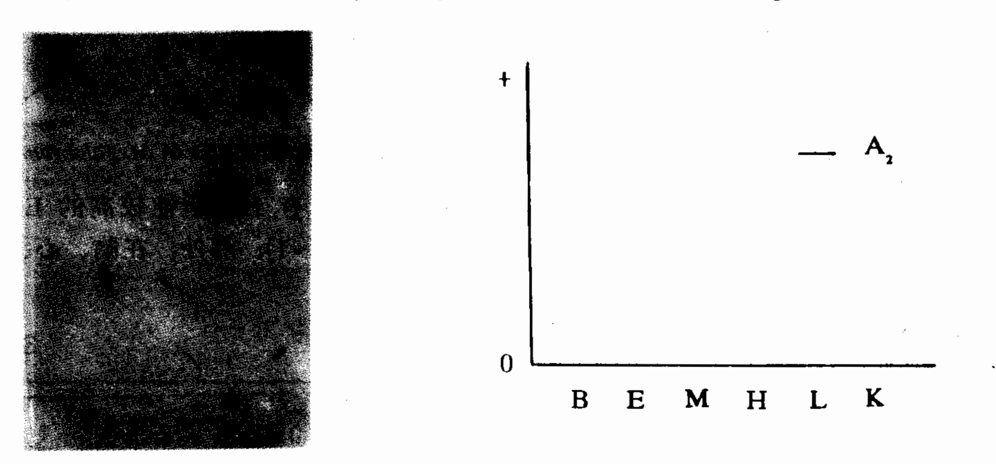


图 5　鲂不同组织中的 GTDH 电泳图谱

Fig. 5 Electrophoretogram of GTDH isozymes expressed in various tissues of *Megalobrama skolkovii*

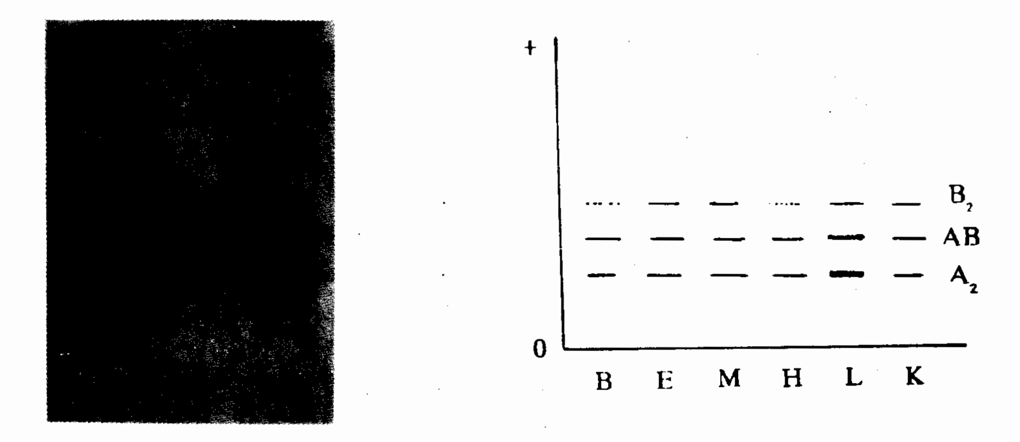
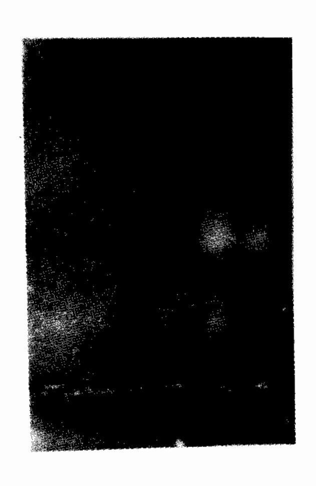


图 6　鲂不同组织中的 G3PDH 电泳图谱

Fig. 6 Electrophoretogram of G3PDH isozymes expressed in various tissues of *Megalobrama skolkovii*

2.1.7 超氧物歧化酶(SOD)(EC1.15.1.1) 鱼类的SOD分为细胞质型(s-SOD)和线粒体型(m-SOD)。延长电泳时间(22 h)，鲂肝及肾组织电泳图谱中出现两个区域。两者各由两个基因编码，为二聚体，分别形成3条酶带。其它组织中没有酶带出现(图7)。



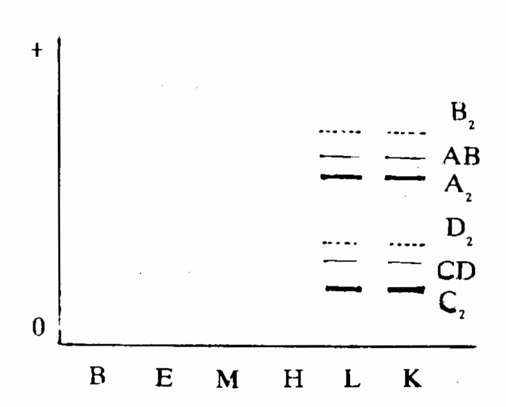
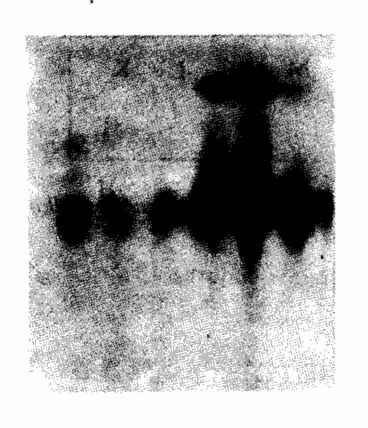


图7 鲂不同组织中的SOD电泳图谱

Fig. 7 Electrophoretogram of SOD isozymes expressed in various tissues of *Megalobrama skolkovii*

2.1.8 酯酶(EST)(EC3.1.1.-) 鲂的6种组织中均有1条活性较高的EST同工酶(EST-4)，心、肝、肾组织中有另1条较强的酶带(EST-1)，另外，在脑、心、肝组织中出现两条酶带(EST-2、-3)(图8)。



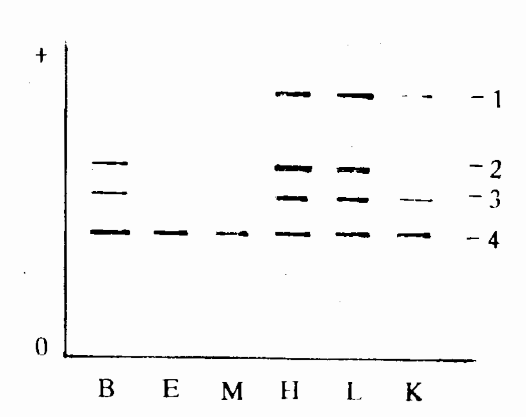


图8 鲂不同组织中的EST电泳图谱

Fig. 8 Electrophoretogram of EST isozymes expressed in various tissues of *Megalobrama skolkovii*

2.2 同工酶的个体发育谱式

2.2.1 LDH和IDH 鲂的未受精卵及整个胚胎发育阶段均只有两条LDH同工酶带($LDH-B_4$，$LDH-AB_3$)，直到出膜后才开始出现有LDH-A和-B亚基聚合而成的5条LDH同工酶带。肝脏特异性表达的$LDH-C_4$酶带直到卵黄吸尽期才开始出现染色活性。IDH同工酶在胚胎发育阶段一直没有检测到活性，直到孵出期才有1条染色较弱的

染色活性酶带(图 9a、b)。

2.2.2 ADH 和 GTDH　鲂早期发育中均未发现两种同工酶的变化。从未受精卵开始，一直可以检测到 1 条 ADH 同工酶带。GTDH 同工酶也出现 1 条不变的酶带，染色活性稳定(图 10a、b)。

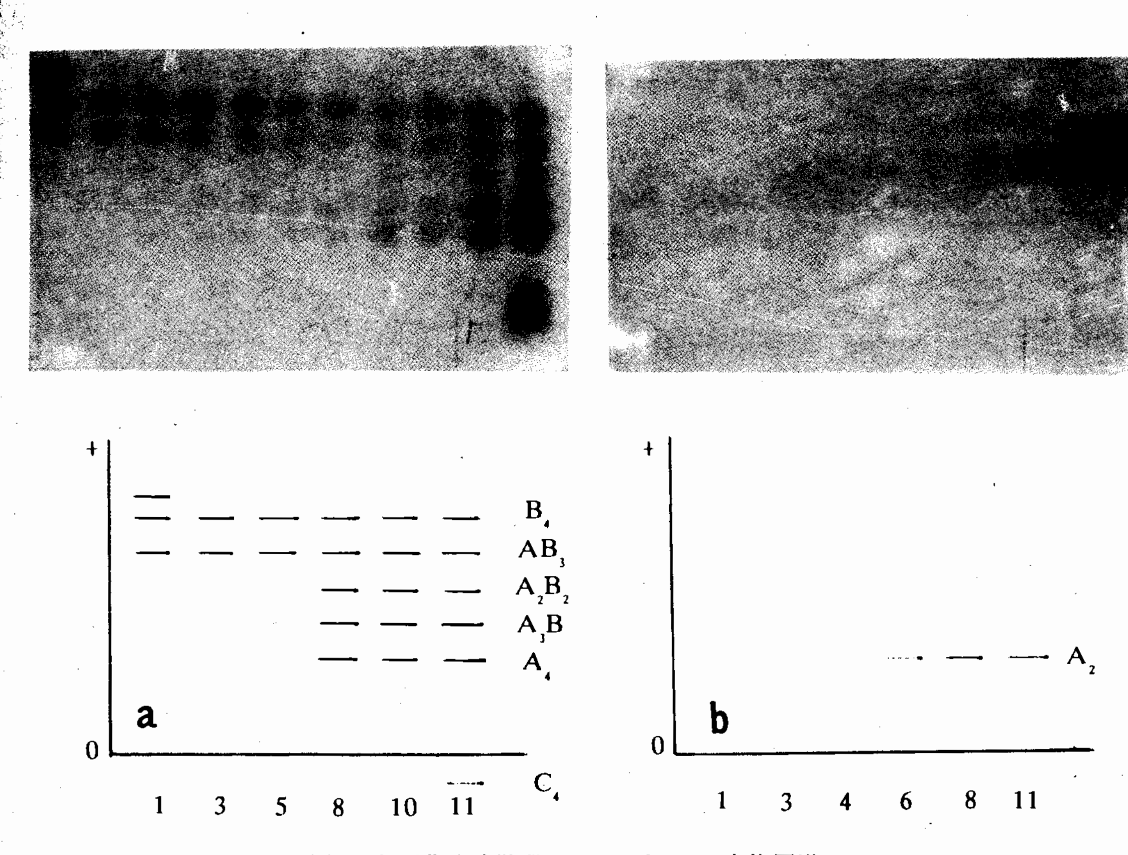


图 9　鲂早期发育阶段的 LDH 和 IDH 电泳图谱

Fig. 9 Electrophoretograms of LDH and IDH isozymes of the early developing *Megalobrama skolkovii*

(图下数字为表 1 中样品编号，下同)

(numbers at the bottum are sample numbers of table 1; the same below)

2.2.3 MDH 和 G3PDH　鲂整个早期发育过程中，MDH 同工酶 MDH-C_2 和 MDH-A_2 一直有较高的染色活性，其它酶带相对活性较低。但未发现有变化。G3PDH 只检测到-A_2 酶带，没有出现-AB 和-B_2 酶带(图 11a、b)。

2.2.4 IDDH 和 SOD　IDDH 同工酶只在鲂的未受精卵中检测到 1 条阴极活性酶带，阳极带未发现。在受精后的样品中均没有 IDDH 的酶带出现。SOD 同工酶在未受精卵到心跳即可检测出 1 条酶带(SOD-A_2)，活性逐渐减弱，心跳期后不能检测出 SOD 同工酶活性(图 12a、b)。

2.2.5 EST　鲂早期发育过程中检测到 EST-4 带的活性。从未受精卵到心跳期，酶带的活性渐减弱，出膜后直至黑色素期 EST-4 酶带活性消失。从体色素形成期开始，EST-4 酶带活性逐渐增强(图 13)。

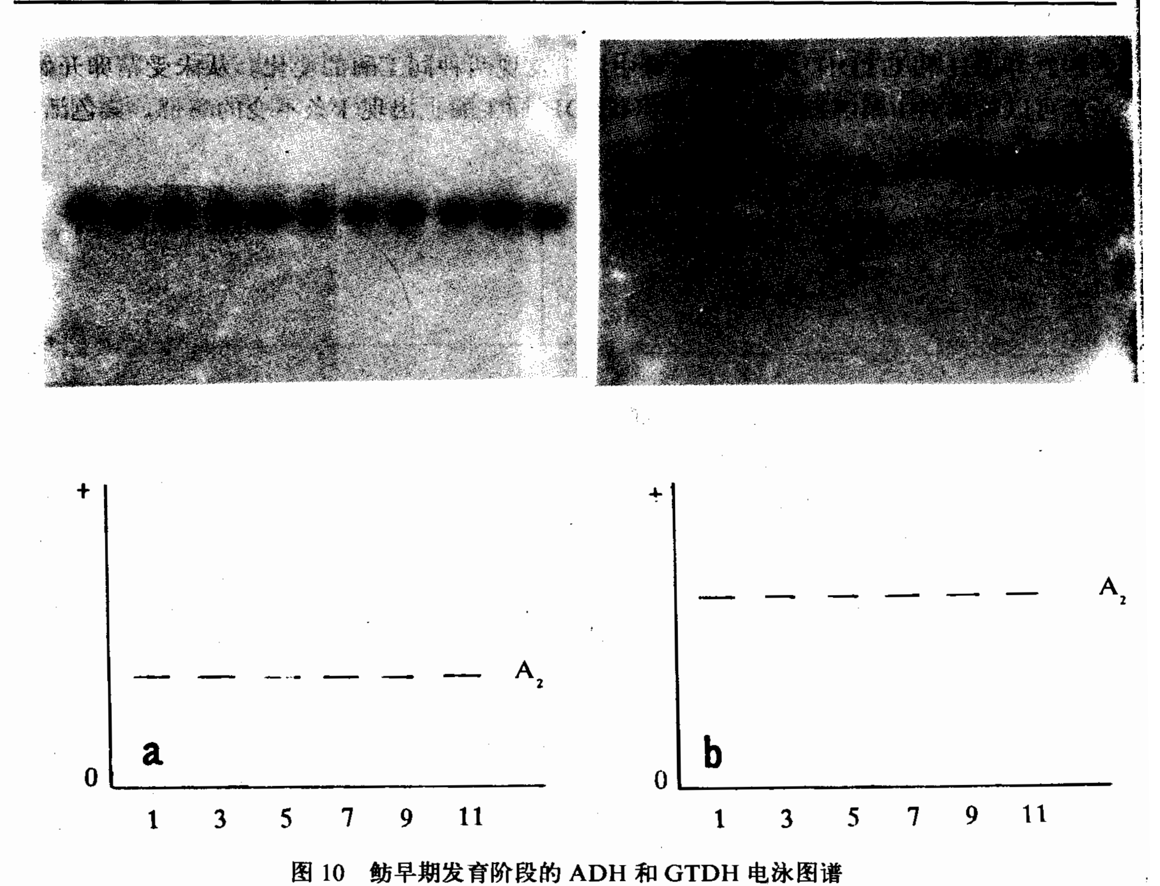


图 10　鲂早期发育阶段的 ADH 和 GTDH 电泳图谱

Fig. 10 Electrophoretograms of ADH and GTDH isozymes of the early developing *Megalobrama skolkovii*

3　讨论

3.1　鲂不同组织器官中同工酶的表达

同工酶在不同组织器官中的特异表达是基因及其调控机制演化的结果，进而也反映物种进化的关系。如在低等硬骨鱼类中，LDH-C 在很多组织中均表达，而在较进化的硬骨鱼类中，LDH-C 只在眼或肝中表达。与其它鱼类相比，鲂同工酶谱及其遗传基础有如下特点。

(1) 鲂肾脏和肝脏的 LDH-A_2B_2 与 LDH-AB_3 及 LDH-AB_3 与-B_4 之间可以分辨出 1 条酶带。一般认为是 LDH 的次级酶带或是由 Ldh-C 亚基与-A 或-B 亚基聚合而成杂合四聚体。在肝组织有一靠近起点的阳极带，与李思发等(1990)在鲢、鳙鱼肝组织中观察到的情况相似，认为此带为 Ldh-C_2。

(2) IDDH 同工酶的表现形式与以往的报道也不尽相同。吴力钊等(1992)报道鳙鱼的 IDDH 同工酶由两个基因编码，在肝脏中表达，表型为 3 条带，有研究报道鲢、鳙、草鱼肝脏中只有 1 条谱带，由 1 个座位 Sdh-A 所编码(李思发等，1990；Magee 等，1982)。李思发等(1992)在团头鲂同工酶的研究中未能检测到 IDDH 的活性，本研究在鲂

肝脏中观察到 2 条酶带，1 条为阴极带，活性高，另 1 条为阳极带。认为它们是有两个座位编码，两种亚基并不聚合成杂合酶体。

(3) 一般认为鱼类的 ADH 和 IDH 为二聚体酶，分别由 2 个和 3 个基因控制。本研究中只在肝中观察到 1 条 ADH 酶和 1 条 IDH 酶，表现为单基因座位控制的单体或多聚体模式。也有作者发现同样情形(李思发等，1990；Magee 等，1982)。这可能因物种演化和基因调控机制差异所致。

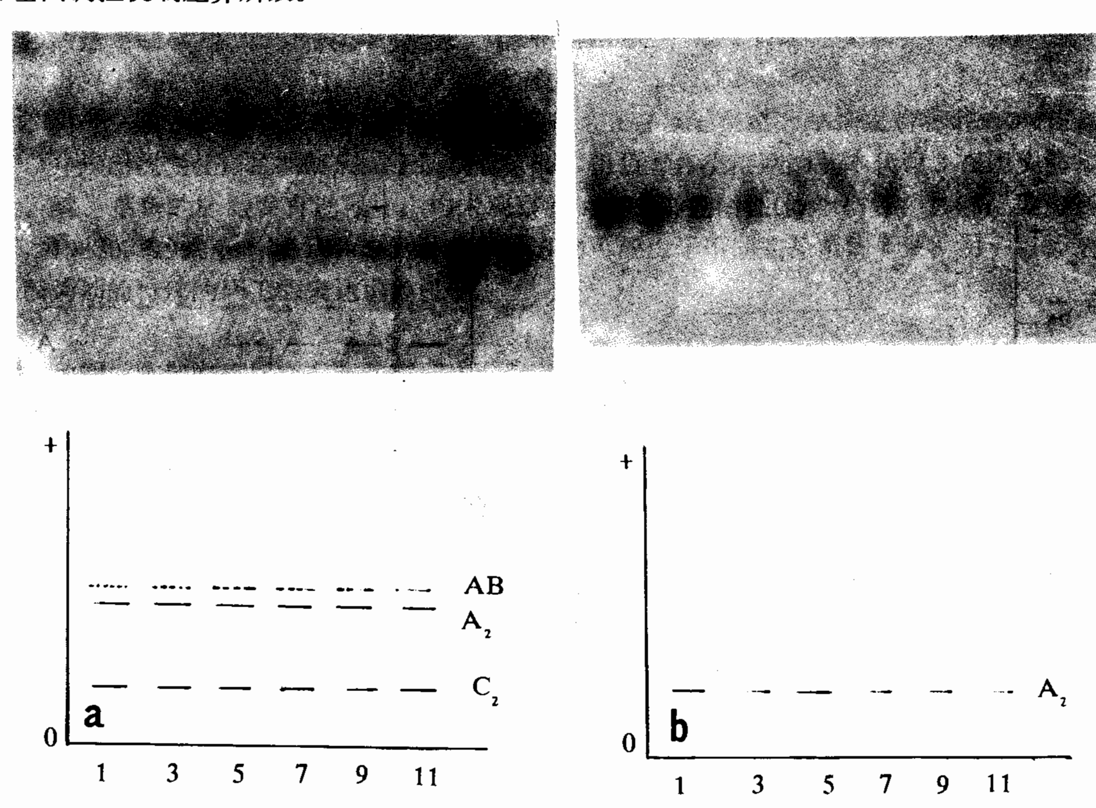


图 11 鲂早期发育阶段的 MDH 和 G3PDH 电泳图谱

Fig. 11 Electrophoretograms of MDH and G3PDH isozymes of the early developing *Megalobrama skolkovii*

3.2 鲂早期发育过程中同工酶基因表达的一般模式及特点

鲂发育过程中 9 种同工酶在卵孵出期之前均无明显变化，除个别酶外，未受精卵和胚胎发育各期的同工酶谱基本相同。一般认为，鱼类胚胎发育早期的蛋白质合成是利用卵子发生过程中累积的 m-RNA 为模板进行的，因而，这一时期内一般只有母体蛋白质的合成(Kirichnnikov，1981；Shaklee 等，1977)。由胚胎基因控制下的新酶分子的合成要到胚胎发育的后期甚至胚胎发育完成以后(吴力钊等，1992)。

本研究观察到鲂的 LDH 同工酶基因表达情形与团头鲂(傅予昌等，1988)的相似。胚胎发育时期有两条稳定的 LDH-B_4，-AB_3，直到孵出才出现 5 条酶带。到卵黄吸尽期开始出现 LDH-C 的表达，认为其与相关器官的形成及功能分化有关(Champion 等，

图 12 鲂早期发育阶段的 IDDH 和 SOD 电泳图谱

Fig. 12 Electrophoretograms of IDDH and SOD isozymes of the early developing *Megalobrama skolkovii*

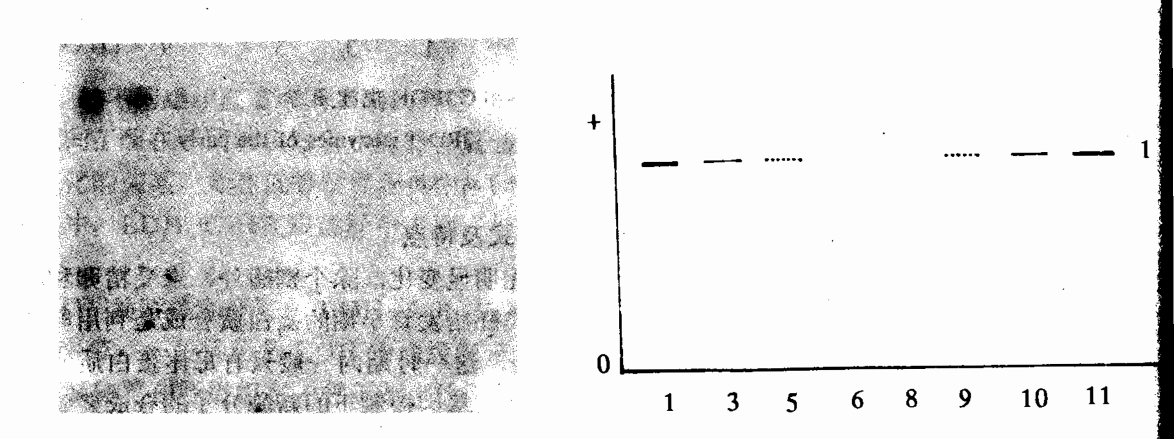


图 13 鲂早期发育阶段的 EST 电泳图谱

Fig. 13 Electrophoretograms of EST isozymes of the early developing *Megalobrama skolkovii*

1975)。这是同工酶早期发育过程基因表达的典型模式。另外，在未受精卵中发现有一趋前的阳极酶带，在其后的时期消失，这一现象在团头鲂、鲢、鳙、草鱼(傅予昌等，

1988；吴力钊等，1987b，1992)中均未观察到，其遗传基础有待进一步研究。

IDDH在未受精卵中有一阴极带，而在其后的时期消失，在鲢、鳙、草鱼中没有染色活性酶带出现(吴力钊等，1987b，1992)，这可能与鲂卵细胞形成的酶代谢机制有关。SOD同工酶在未受精卵和胚胎发育时期有活性，逐渐减弱到心跳期后消失，这可能是母体蛋白质合成衰减而胚胎基因控制的酶合成滞后所造成。EST同工酶的情形相似，Est-4从未受精卵到心跳期活性渐弱直至消失，而在胚后发育的体色素形成期重新出现，并逐渐增强，这是胚胎基因开始表达的表现。IDH同工酶在胚胎发育阶段无活性，而在孵出期以后出现1条酶带，这与IDH座位的激活有关。

另外一类酶。如MDH、ADH、G3PDH和GTDH在整个早期发育过程中均有表达，并未出现变化。这些酶应属于所谓管家酶，担负着各类细胞的基本代谢。在团头鲂及鲢、鳙、草鱼的胚胎发育过程中，均未观察到ADH染色活性(傅予昌等，1988；吴力钊等，1987b，1992)，作者认为，这种差异一方面可能由于不同实验系统所致，另一方面则是因为鲂的特殊的同工酶表达调控机制。

致谢　陈毅峰副研究员和张鹗同志参加了部分工作，胡贻智老师提供了材料鱼，特表示感谢。

参 考 文 献

王祖熊，刘峰，1985. 白鲢不同繁育群体中乳酸脱氢酶和酯酶同工酶个体发生多态性的研究. 水生生物学报，**9**(3)：285—292.

李思发等，1990. 长江、珠江、黑龙江链、鳙、草鱼种质资源研究.上海科学技术出版社. 83—101.

李思发等，1991. 团头鲂种群间的形态差异和生化遗传差异. 水产学报，**15**(3)：204—210.

吴力钊，王祖熊，1987a. 草鱼同工酶的发育遗传学研究 I. 不同组织器官中同工酶分析. 遗传学报，**14**(4)：278—286.

吴力钊，王祖熊，1987b. 草鱼同工酶的发育遗传学研究 II. 早期发育过程中的同工酶分析. 遗传学报，**14**(5)：387—394.

吴力钊，王祖熊，1992. 鳙鱼同工酶发育遗传学研究. 水生生物学报，**16**(1)：8—17.

罗莉中，王春元，1984. 金鱼同工酶的发生遗传学研究 II. 金鱼胚胎发育不同时期乳酸脱氢酶同工酶分析. 遗传学报，**11**(6)：487—493.

傅予昌，王祖熊，1988. 团头鲂的胚胎及成体组织中八种同工酶系统的研究. 水生生物学报，**12**(3)：219—229.

Champion M J *et al*, 1975. Developmental genetics of teleost isozymes. In：C L Market, (ed.), IsozymesⅢ：Developmental Biology. New York：Acad. Press, **3**：414-437.

Hunter R L, Market C L, 1957. Histochemical demonstration of enzymes by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, **125**：1294-1295.

Kirpichnnikov V S, 1981. The use of biochemical variation in embryological, populational and evolutionary studies of fishes. In：Genetic bases of fish slection. Tranlated by Ganse G G. Berlin：Springer-Verlag. 200-2544.

Magee S M, Philip D P, 1982. Biochemical genetic analyses of the grass carp bighead carp F1 hybrid and the parental species, *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **111**：593-602.

Market C L, 1983. Isozymes: conceptual history and biological significamce. In Rattazzi M C, Scandalios J G, Whitt G S (eds.), Isozymes, current topics in biological and medical research, New York: Molecular structure and Regulation Liss, **7**: 1-17.

Murphy R W *et al*, 1990. Proteins I: Isozyme electrophoresis. In: David M H, Craig M, (eds.), Molecular systomatics. Sinauer, Associates, Inc. Sunderland, MA. 45-126.

Shaklee J B *et al*, 1973. Specialized lactate dehydrogenase isozymes: The molecular and genetic basis for the unique eye and liver LDHs of teleost fishes. *J. Exp. Zool.*, **185**: 217-240.

Shaklee T B, Whitt G S, 1977. Patterns of enzyme onotogeny indeveloping sunfish. *Differentiation*, **9**: 85-95.

Shaw C R, Prasad R, 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes, a recipe. *Biochem. Genet.*, **4**(2): 279-320.

Smith O, 1955. Zone electrophoresis in starch gels: Group variationsin the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.*, **61**: 629-641.

Waples R S, 1987. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. *Evolution*, **4**: 385-400.

Whitt G S *et al*, 1975. Evolution of the lactate dehydrogenase isozymes of fishes. In: Marker C L (ed.), Isozymes IV: Genetics and evolution. Now York: Academic Press, 381-400.

Wilson F R *et al*, 1973. Lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase isozyme patterns in tissues of temperature acclimated goldfish (*Garassius auratus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **46B**: 105-116.

STUDY ON ISOZYMES IN TISSUES AND ONTOGENY OF *Megalobrama skolkovii*

Wang Yaping Liu Huanzhang

(*Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072)

Abstract

By use of starch gel electrophoresis, the patterns of expression of nine isozymic systems (LDH, MDH, ADH, IDH, GTDH, IDDH, G3PDH, SOD, EST) were investigated in six differentiated adult tissues (brain, eye, muscle, heart, liver and kidney) and the early developmental stages of *Megalobrama skolkovii.* Isozymegenes in *Megalobrama skolkovii* apparently exhibit a tissue specific expression. During the early developmental stages, LDH, IDH, IDDH, SOD and EST isozymes have different patterns of ontogenetic changes; MDH, ADH, ATDH and G3PDH isozymes are present but exhibit no evident developmental change. The above results provide basic information for the population genetic structure and population evolution of *Megalobrama skolkovii.*

Key words Electrophoresis, Isozymes, Developmental genetics, *Megalobrama skolkovii*